

VU Research Portal

Cellular and Molecular Mechanisms in Hypertrophic Scar Formation

van der Veer, W.M.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van der Veer, W. M. (2011). *Cellular and Molecular Mechanisms in Hypertrophic Scar Formation: Potential Targets for Therapy*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

NEDERLANDSE SAMENVATTING VOOR NIET-INGEWIJDEN

CELLULAIRE EN MOLECULAIRE MECHANISMEN VAN LITTEKENHYPERTROFIE: POTENTIËLE DOELWITTEN VOOR THERAPIE

Inleiding

De huid is ons grootste orgaan en dient als een beschermende barrière tegen infecties en overmatig verlies van water, en helpt ons lichaam op de juiste temperatuur te houden. De huid kan worden onderverdeeld in een oppervlakkige laag, de opperhuid, en een diepere laag, de lederhuid. De opperhuid bevat voornamelijk opperhuidcellen (keratinocyten), en de lederhuid zowel steunstof-producerende cellen (fibroblasten) als steunstoffen, met name collageen. Deze steunstoffen, ook wel extracellulaire matrix genoemd, geven stevigheid aan de huid. Daarnaast bevinden zich in de huid verschillende typen witte bloedcellen, die ons beschermen tegen infectie. Al de verschillende cellen en stoffen in de huid hebben hun eigen specifieke functie maar werken ook erg nauw samen.

De huid is een van de meest frequent beschadigde menselijke organen. Als de integriteit van de huid is geschonden, is wondgenezing cruciaal om deze natuurlijke barrière te herstellen. Het genezingsproces van de wond, die normaal gesproken resulteert in de vorming van een litteken, is een uiterst complex proces, waarbij tal van verschillen cellen, celstoffen en steunstoffen een rol spelen. Overmatig bloedverlies wordt voorkomen door de vorming van een bloedstolsel, die verder dienst doet als een matrix die ontstekingscellen, endotheelcellen, fibroblasten en keratinocyten begeleidt. Door samen te werken vormen deze cellen nieuwe bloedvaten, produceren ze extracellulaire matrix en migreren ze vanaf de wondranden over het oppervlak van de wond totdat een nieuwe laag de wond bestrijkt. Fibroblasten worden aangezet tot het produceren van extracellulaire matrix en trekken vervolgens de wondranden naar elkaar toe.

Afgezien van oppervlakkige (brand)wonden die binnen een paar dagen genezen zullen de meeste wonden resulteren in een zichtbaar litteken. Dit litteken ligt normaal gesproken verscholen in de huid en geeft geen klachten. In sommige individuen echter, met name in brandwondenslachtoffers, resulteert de wondgenezing in een overvloedige productie van extracellulaire matrix, wat resulteert in een hypertrofisch litteken. Hypertrofische littekens zijn verheven boven huidniveau en hebben een rode of paarse kleur, een verhoogde stijfheid en een ruwe textuur. Patiënten met hypertrofische littekens klagen vaak over jeuk en pijn, en ervaren ernstige functionele en cosmetische problemen, met name veroorzaakt door verlies van beweeglijkheid van gewrichten en anatomische misvorming. Deze complicaties kunnen een indicatie zijn voor chirurgische correcties, welke helaas niet altijd een bevredigend resultaat geven.

Hypertrofische littekens worden soms vergeleken met een ander soort lelijk litteken, namelijk keloïden. Deze zijn eveneens verhoogd boven huid niveau, maar

woekeren ook buiten de grenzen van de oorspronkelijke huidbeschadiging. Keloïden ontstaan ook op een andere wijze dan hypertrofische littekens. Daarom is het belangrijk om duidelijk onderscheid te maken tussen deze twee soorten wanneer je de ontstaanswijze van deze complicaties van de wondgenezing onderzoekt.

Onderzoek naar de moleculaire en cellulaire mechanismen van wondgenezing en littekenvorming heeft geleid tot een beter begrip van mechanismen die betrokken zijn bij littekenhypertrofie. Het meeste onderzoek dat zich richt op wondgenezing wordt momenteel uitgevoerd in reageerbuizen, petrischalen of met gebruik van proefdieren. Het is echter bekend dat de cellen die betrokken zijn bij de wondgenezing gedurende het proces kunnen veranderen en zich kunnen aanpassen aan de rol die zij moeten spelen. Dit proces is erg moeilijk na te bootsen in het laboratorium. Daarnaast verloopt de wondgenezing in proefdieren in bepaalde aspecten heel anders dan de wondgenezing in de mens. Bovendien is littekenhypertrofie een proces wat van nature alleen voorkomt bij de mens. Daarom is het bestuderen van mechanismen die verantwoordelijk zijn voor littekenhypertrofie het meest betrouwbaar wanneer je gebruikt maakt van menselijk materiaal. In dit proefschrift hebben we ons specifiek gericht op het ontdekken van factoren die betrokken zijn bij littekenhypertrofie, waarvoor we uitsluitend gebruik hebben gemaakt van menselijk materiaal.

Ontdekkingen in dit proefschrift

In de afgelopen decennia is een aanzienlijke hoeveelheid onderzoek gedaan naar aanleg en risicofactoren voor de ontwikkeling van keloïden. Er is echter weinig bekend over de risicofactoren voor littekenhypertrofie. Bovendien zijn de meeste studies over littekenhypertrofie niet homogeen. Bijgevolg variëren schattingen van de prevalentie van littekenhypertrofie sterk, en is er weinig betrouwbare kennis over risicofactoren voor littekenhypertrofie. De identificatie van patiënt-gerelateerde risicofactoren is bijzonder waardevol om een hoog-risico populatie te definiëren waar vervolgens rekening mee kan worden gehouden bij het opzetten van experimentele studies. In **hoofdstuk 4** hebben wij de incidentie van hypertrofische littekenvorming beschreven en de relatie tussen littekenhypertrofie en verschillende kenmerken van patiënten onderzocht.

In onze patiëntengroep ontwikkelde 60% een hypertrofisch litteken na een operatie, meestal tijdens de eerste drie maanden na de operatie. De meeste hypertrofische littekens die drie maanden na de operatie aanwezig waren, waren nog steeds hypertrofisch na 12 maanden. Jonge, niet-rokende patiënten waren het meest gevoelig voor de vorming van littekenhypertrofie.

Wanneer we kijken naar hypertrofische littekens op moleculair en cellulair niveau, vertonen deze littekens afwijkingen in de opperhuid die sterk lijken op de afwijkingen die worden waargenomen in de huidaandoening psoriasis. Psoriasis kan effectief worden behandeld met calcipotriol, een synthetisch derivaat van vitamine D. Daarom hebben wij een gerandomiseerd, dubbelblind, placebo-gecontroleerd onderzoek uitgevoerd om de preventieve werking van calcipotriol op littekenhypertrofie te onderzoeken en de biochemische eigenschappen van de opperhuid tijdens littekenhypertrofie te analyseren. Dit onderzoek is beschreven in **hoofdstuk 5**.

We hebben vastgesteld dat lokaal gebruik van calcipotriol tijdens de eerste 3 maanden van de wondgenezing geen invloed heeft op de incidentie van littekenhypertrofie. Verder zagen we een sterke associatie tussen de activering van keratinocyten en het ontstaan van hypertrofische littekens. Deze verlengde activering van de keratinocyten is geassocieerd met bepaalde ontstekingsprocessen die ook de productie van extracellulaire matrix aanzetten. Wat de oorzaak is van de verlengde activering van keratinocyten is niet helemaal duidelijk, maar omdat geactiveerde keratinocyten over het algemeen alleen aanwezig zijn tijdens de inflammatoire fase van de wondgenezing lijkt het erop dat een verlengde inflammatoire fase een belangrijke voorwaarde is voor littekenhypertrofie.

Om de invloed van de inflammatoire reactie op littekenhypertrofie te onderzoeken, hebben we de wondgenezing onderzocht in patiënten die hartchirurgie hadden ondergaan. Zij houden hier in de meeste gevallen een verticaal litteken midden op de borst (presternaal) aan over. Deze presternale littekens hebben een hoge incidentie van littekenhypertrofie. De patiënten die tijdens de operatie werden aangesloten op een hart-long machine, kregen voor en na de operatie een hoge dosis dexamethason, een ontstekingsremmer, toegediend. De presternale littekens van de patiënten die dexamethason toegediend hadden gekregen werden beoordeeld en gemeten, en vergeleken met een controlegroep bestaande uit patiënten die geen dexamethason toegediend hadden gekregen. Op die manier konden wij inzicht krijgen in het effect van de vroege ontstekingsreactie op littekenvorming in de lange termijn. Dit onderzoek staat beschreven in **hoofdstuk 6**.

We zagen geen significante verschillen in incidentie van littekenhypertrofie bij het vergelijken van beide groepen. Echter werden de presternale littekens aanzienlijk breder en hoger in de groep die dexamethason toegediend had gekregen vergeleken met de controlegroep, en deze verschillen waren vooral aanwezig bij patiënten die hypertrofische littekens ontwikkelden. Deze resultaten suggereren dat toediening van dexamethason rond de operatie invloed heeft op de afmetingen van het litteken tot wel 52 weken na de operatie. Een verklaring voor deze bevindingen zou kunnen liggen in het effect van de hart-long machine, of in het effect dat dexamethason heeft op de activatie van macrofagen, een ontstekingscel die een belangrijke rol heeft tijdens de wondgenezing.

Macrofagen worden beschouwd als belangrijke spelers in de wondgenezing omdat ze een bron vormen voor verschillende stoffen die van essentieel belang zijn voor het dirigeren van de wondgenezing en de productie van extracellulaire matrix. Daarnaast is de afgelopen jaren duidelijk geworden dat de macrofaag een belangrijk rol speelt bij de overvloedige productie van extracellulaire matrix tijdens ziekteprocessen in verschillende organen. Deze overvloedige productie van extracellulaire matrix in organen noemen we fibrose. Maar de macrofagen die aanwezig zijn in een wond gedragen zicht niet allemaal hetzelfde. Sommigen macrofagen richten zich met name op het doden van bacteriën, zodat infectie van de wond wordt voorkomen. Deze macrofagen noemen we klassiek-geactiveerd. Anderen richten zich juist op het aansturen van keratinocyten en fibroblasten zodat deze de wond kunnen gaan dichten met extracellulaire matrix. Deze macrofagen noemen we alternatief-geactiveerd. Onze

hypothese is dat tijdens de vorming van een hypertrofisch litteken de macrofagen te veel bezig zijn met het aansturen van fibroblasten, in plaats van het bestrijden van infectie. Wij verwachtten dus meer alternatief-geactiveerde macrofagen aan te treffen tijdens littekenhypertrofie. In **hoofdstuk 7** hebben we geprobeerd te bepalen op welke manier de macrofagen zich tijdens de vorming van een hypertrofisch litteken gedragen en hoe zij met andere cellen in de huid communiceren.

Uit ons onderzoek blijkt dat tijdens de vorming van een hypertrofisch litteken er een verhoogd aantal macrofagen in het weefsel aanwezig is. Deze macrofagen hebben echter kenmerken van zowel klassiek- als alternatief-geactiveerde macrofagen. Op basis van de stoffen die deze macrofagen produceren hebben wij niet onomstotelijk kunnen vaststellen of de macrofagen voornamelijk klassiek- of alternatief-geactiveerd zijn. Toch lijkt er een evenwicht te bestaan die tijdens littekenhypertrofie richting de alternatieve activatie lijkt te verschuiven.

Naast verschillen in het ontstekingsproces zijn hypertrofische littekens vaak roder en warmer, en hebben ze een verhoogde bloedstroom. Dit impliceert de aanwezigheid van verhoogd aantal bloedvaten hypertrofische littekens vergeleken met normale littekens. In **hoofdstuk 8** geven we inzicht in de moleculaire details over de vorming van nieuwe bloedvaten tijdens littekenhypertrofie. Onze studie is de eerste die het tijdsverloop van de vorming van nieuwe bloedvaten en het mechanisme daarvan tijdens littekenhypertrofie beschrijft.

Uit ons onderzoek blijkt dat er een significant hoger aantal bloedvaten aanwezig waren in hypertrofische littekens dan in normale littekens. Daarnaast vonden we dat de stoffen die de wanden van de bloedvaten aanzetten tot de vorming van nieuwe vaatjes, genaamd Angiopoietines, relatief hoger aanwezig waren tijdens littekenhypertrofie. Bovendien was een stof die bloedvatcellen gebruiken om zich door het weefsel heen te kunnen verplaatsen, namelijk urokinase, verhoogd tijdens littekenhypertrofie. Deze verschillen tussen de vorming van een normaal en een hypertrofisch litteken bevestigen de aanwezigheid van een klimaat waarin zich makkelijk nieuwe bloedvaten kunnen vormen.

Relevantie van dit onderzoek

De bevindingen beschreven in dit proefschrift leiden tot meer begrip van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de vorming van hypertrofische littekens. Doordat wij hebben ontdekt dat hypertrofische littekens een verhoogd aantal bloedvaten hebben, kunnen we in de toekomst mogelijk ingrijpen in het proces van verhoogde bloedvatvorming, om op die wijze ervoor te zorgen dat de stoffen die nodig zijn voor de ontwikkeling van een hypertrofisch litteken niet meer op de plaats van bestemming kunnen komen. Uit onze bevindingen blijkt verder dat de vroege ontstekingsreactie bepalend is voor het verdere verloop van de wondgenezing en littekenvorming. De rol van alternatief-geactiveerde macrofagen tijdens littekenhypertrofie zal nog verder onderzocht moeten worden, maar zal vrijwel zeker aanknopingspunten opleveren voor een preventieve therapie. Kenmerkend van deze therapie moet zijn dat het vroeg ingrijpt in de cascade die leidt tot littekenhypertrofie.